

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie
der Freien Universität Berlin

ÜBER DEN MAGNESIUM STOFFWECHSEL
VON ESCHERICHIA COLI

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Christian-Friedrich Hoffmann

aus Liegnitz

1977

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie
der Freien Universität Berlin

Über den Magnesium Stoffwechsel
von Escherichia coli

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von
Christian-Friedrich Hoffmann
aus Liegnitz

Referent: Prof. Dr. med. T. Günther

Korreferent: Prof. Dr. med. K.-O. Gundermann



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 25. April 1977

Inhaltsverzeichnis

Einleitung:	S. 1
Methodik :	S. 7
Ergebnisse:	S.10
Gesamt-Mg-Gehalt	S.10
Inhibitoreneinflüsse	S.14
Mg ²⁺ Ionenaktivität	S.15
Energiestoffwechsel	S.18
Stoffwechsel Mg-arm gewachsener Zellen	S.21
Stoffwechsel synchronisierter Zellen	S.22
Diskussion	S.24
Zusammenfassung	S.27
Literaturverzeichnis	S.28

Einleitung

Magnesium ist ein lebensnotwendiges Element, das überwiegend intrazellulär vorkommt. Beim Fehlen von Mg treten bei Menschen und Tieren mannigfaltige Mangelerkrankungen auf (2,3).

Mg ist notwendig für die Funktion zahlreicher Enzyme, die unter anderem an der oxidativen Phosphorylierung, am Stoffwechsel von Kohlenhydraten und Lipiden, sowie an allen ATP abhängigen Biosynthese-Reaktionen beteiligt sind (1). Daneben ist Mg nötig für die Stabilität von biologischen Membranen und Organellen.

Die Wirkungen des Mg können auf seine schwachen komplexbildenden Eigenschaften zurückgeführt werden.

An den Zytoplasma- und Mitochondrienmembranen wird eine Chelatbildung des Mg zusammen mit Calcium vermutet, die eine Quervernetzung membrangebundener Liganden verursacht und somit zu einer Verringerung der passiven Permeabilität führt (1,4). Neben dieser Wirkung auf den Membrantransport können spezifische membrangebundene Transportsysteme durch Magnesium aktiviert werden, zum Beispiel die Mg-abhängige Na-K-ATPase oder das Zuckertransportsystem von KUNDIG und ROSEMAN.

An den Nucleinsäuren findet eine Chelatbildung des Mg mit negativ geladenen Phosphatresten statt, die zu einer Abnahme der negativen Ladung und zusätzlichen Quervernetzung der Nucleinsäurestränge führt. Daraus resultiert eine Stabilisierung ihrer Sekundärstruktur. Dies zeigt sich zum Beispiel daran, daß die Schmelzkurve von DNA durch Mg zu höheren Temperaturen verschoben wird.

In ähnlicher Weise sind verschiedene ribosomale Reaktionen ebenfalls von Mg abhängig, wie zum Beispiel die Bildung des Initiationskomplexes, das ist die Zusammenlagerung einer 30-S Ribosomen-Untereinheit mit der Messenger-RNA, und Aminoacyl-t-RNs, wobei die schwachen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen komplementären Basenpaaren (Codon-Anticodon) durch zusätzliche Vernetzung von Phosphatresten durch Mg stabilisiert werden (1,4).

Bei der Wirkung des Mg auf enzymatische Reaktionen kann das thermodynamische Gleichgewicht verschoben werden, wenn ein Reaktionspartner mit Mg einen Komplex bildet, oder Ausgangs- und Endprodukte verschieden starke Mg-Komplexe bilden. Außerdem werden die Mg-abhängigen Enzyme aktiviert, die praktisch an allen Stoffwechselfunktionen beteiligt sind. In Abb.1 ist die quantitative Beziehung zwischen dem p Mg (das ist der negative dekadische Logarithmus der Mg-Ionenaktivität) und der Enzymaktivität dargestellt. Diese Glockenkurve wird durch die Überlagerung zweier sigmoider Kurven erklärt. Die gestrichelte Kurve zeigt die Aktivierung des Enzyms als Funktion des p Mg, die gepunktete die Hemmung des Enzyms in Abhängigkeit von p Mg:

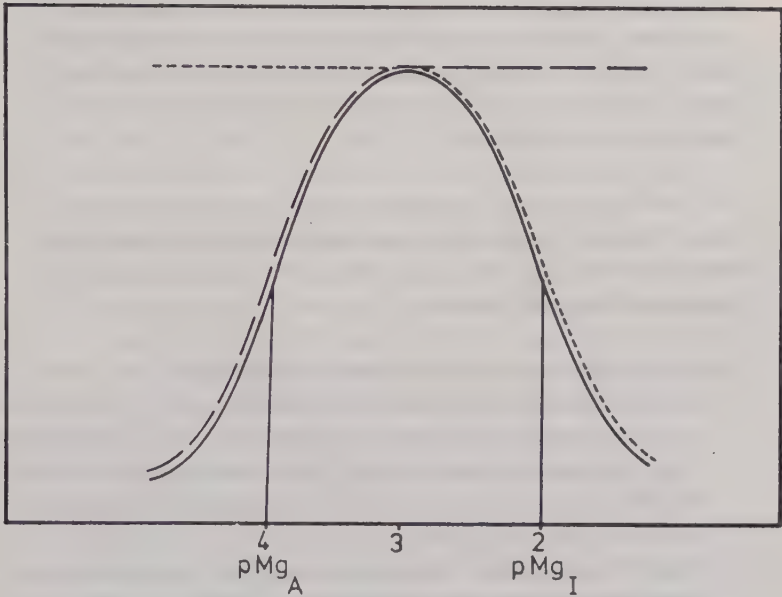


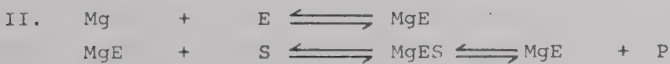
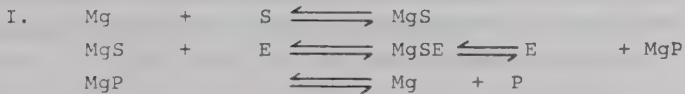
Abbildung 1

Abhängigkeit eines durch Mg aktivierbaren Enzyms von der Mg-Ionenkonzentration (p Mg)

pMg_A : pMg bei halbmaximaler Aktivierung

pMg_I : pMg bei halbmaximaler Hemmung durch Mg.

Wird ein Enzym durch Mg aktiviert, können je nach Enzym folgende Reaktionen ablaufen (s. Schema):



I. Ein Mg^{2+} -Ion kann mit dem Substrat (S) einen Mg-Substrat-Komplex bilden (MgS), der dann mit dem Enzym (E) reagiert, wodurch ein tertiärer Mg-Enzym-Komplex entsteht ($MgSE$). Dieser Komplex wird unter der Bildung eines Produktes (P) gespalten, wobei das Enzym wieder freigesetzt wird.

II. Im anderen Fall reagiert Mg mit dem Enzymprotein unter Bildung eines Mg-Enzym-Komplexes, der dann mit dem Substrat (S) einen tertiären Michaelis-Menten-Zwischenkomplex $MgES$ bildet.

Die Rolle des Mg bei diesen Reaktionsfolgen ist:

1. Bei der Komplexbildung mit Mg wird die hohe negative Ladung der Substratmoleküle ATP^{4-} um 2 pro Molekül vermindert, dadurch kann eine Bindung von MgS an E infolge der jetzt verminderten Abstoßung möglich werden.
2. Durch die Bindung von Mg an E entsteht die aktive Konformation des Metallo-Enzyms, sodaß das Substrat an das aktive Zentrum des Enzyms gebunden werden kann (Schema II).
Beide Möglichkeiten können kombiniert auftreten. Das Substrat kann auch unter Beteiligung des Mg an das Metalloenzym gebunden werden. Ebenso kann durch die Bindung von MgS an das Enzym sich dessen aktive Konformation ausbilden.
3. Innerhalb des Substratmoleküls im Michaelis-Menten-Komplex bewirkt Mg^{2+} durch Elektronenzug eine stärkere Polarisierung und begünstigt so die Spaltung von Bindungen, vorzugsweise der P-O-Bindungen. Zu den oben aufgezählten Wirkungsweisen kommt diese immer hinzu; zusammenfassende Darstellung s. (1).

Alle oben genannten Reaktionen, die zur Aktivierung von Mg abhängigen Enzymen führen, unterliegen dem Massenwirkungsgesetz. Es ist daher möglich, daß Mg regulatorische Funktionen in der Zelle ausübt, wenn sich die Mg^{2+} -Ionenkonzentration ändert. Um dies zu entscheiden, muß man die Mg^{2+} -Ionenaktivität in der Zelle kennen und experimentell ändern. Bei den mannigfaltigen Wirkungen des Mg sind bei einer Änderung der Mg^{2+} -Ionenaktivität diverse Störungen möglich.

Ein Mg-Überangebot ist bei Tieren wie beim Menschen bis zu einer Serum-Mg-Konzentration von ca. 8mM möglich. Darüber tritt eine Mg-Narkose auf. Es ist dabei offen, wieviel Mg^{2+} in die Zelle gelangt, und wieviel Mg^{2+} außen an der Zellmembran gebunden wird. Der Teil, der in die Zelle gelangt ist, wird teilweise durch Komplexbildung abgepuffert (12), sodaß sich der pMg nur wenig ändern wird. Zudem ist die Wirkung des Mg^{2+} vom Logarithmus der intrazellulären Mg^{2+} -Ionenaktivität (pMg) abhängig. Eine Erhöhung der extrazellulären Mg^{2+} -Konzentration im physiologisch möglichen Bereich ist daher von geringer praktischer Bedeutung für das intrazelluläre Geschehen.

Wesentlich stärkere Auswirkungen und praktische Bedeutung bringt eine verminderte extrazelluläre Mg-Konzentration mit sich, so etwa bei zu geringer Zufuhr oder erhöhtem Bedarf (Wachstum, Schwangerschaft, Laktation, proteinreiche Ernährung), verringerter Resorption oder erhöhter Ausscheidung (Alkohol, Diuretica). In diesen Fällen läßt sich bei einem Mg-Mangel eine Abnahme der DNS- und Proteinsynthese und, in geringerem Maße, eine Hemmung der RNS- und Lipoidsynthese nachweisen (24).

Das Ausmaß der Mg-Mangelercheinung hängt von der Wachstumsgeschwindigkeit des Versuchstieres bzw. der verwendeten Zellen ab. Am stärksten ausgeprägt sind sie bei Zellen von E.coli. Während der Entstehung des Mg-Mangels durch Wachsen in Mg-armen Medium mit einer Mg-

Konzentration von 10^{-6} M können die Zellen noch einige Zeit mit maximaler Geschwindigkeit wachsen, bis das Mg im Medium völlig verbraucht ist. Folglich müssen während dieser Phase noch alle Stoffwechselfunktionen normal ablaufen, und die Mg-abhängigen Enzyme aktiv sein. Diese werden jedoch erst bei deutlich höheren Mg^{2+} -Ionenaktivitäten von etwa 10^{-4} - 10^{-3} M aktiviert (4). Das läßt den Schluß zu, daß die Mg-Ionenaktivität einen entsprechenden Wert aufweisen muß, und Mg gegen ein bestehendes elektrochemisches Potential angereichert werden muß (5). Die Reaktionsweise dieses Transportsystems ist noch unbekannt.

In den folgenden Untersuchungen wird versucht, nähere Kenntnisse über die Eigenschaften dieses Transportsystems bei normalen und bei Mg-Mangelverhältnissen zu gewinnen. Von besonderem Interesse sind hierbei die intrazellulären Mg-Ionenaktivitäten. An synchronisiert wachsenden E.coli Zellen wird das Verhalten des Mg-Nettotransports mit Mg^{28} in Abhängigkeit vom Generationszyklus untersucht. Für Untersuchungen der Mg-Funktion in der Zelle und seines dortigen Zustandes sind Escherichia coli Zellen besonders geeignet. Sie lassen sich unter Mg-Mangelbedingungen leicht züchten, im Gegensatz zur tierischen Zelle treten bei ihnen bei Mg-Mangel keine hormonellen Gegenregulationen auf. Während der Züchtung können definierte und reproduzierbare extreme Wachstumsbedingungen eingehalten werden, die sie wesentlich besser als tierische Zellen überstehen.

Methodik

Züchtung

Die Versuche wurden mit *Escherichia coli* B 163 durchgeführt. Die Bakterien wurden in Schrägagarröhrchen bei + 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und im Abstand von 3 Wochen umgezüchtet. Für die Versuche wurden sie in das Nährmedium abgeimpft und in Erlenmeyerkolben bei 37°C unter Begasung mit 95% O₂ und 5% CO₂ über Nacht gezüchtet. Das Nährmedium enthielt im Li-

ter:	NaCl	80mMol
	KCl	30mMol
	(NH ₄) ₂ SO ₄	10mMol
	NH ₄ Cl	15mMol
	K ₂ HPO ₄	30mMol
	KH ₂ PO ₄	30mMol
	Glucose	5 g
	L-Leucin	100 mg
	L-Histidin	100 mg
	L-Methionin	100 mg

Die Kontrollzellen wurden mit 1mMol/l MgCl₂, die Magnesium-Mangelzellen mit 10⁻⁶Mol/l MgCl₂ über Nacht gezüchtet. Die Zellen wurden auf einer Servall-Zentrifuge bei 10.000 g vom Wachstumsmedium abgetrennt und zweimal mit bidestilliertem Wasser gewaschen.

Inkubationsversuche

Die gewaschenen Zellen wurden in einer Zelldichte von etwa 2 mg/ml in 6 ml Tris-HCl Medium, das 0,15 Mol/l Tris-HCl Puffer, pH 7,5; 90mMol/l NaCl; 50 mMol/l KCl 5 g/l Glucose und MgCl₂ wie angegeben enthielt, unter Begasen mit 95% O₂ und 5% CO₂ 10 Min. vorinkubiert. Nach Zugabe der jeweiligen Menge MgCl₂ wurde noch 10 Min. weiter inkubiert. Danach wurden die Proben zentrifugiert und zweimal wie angegeben gewaschen.

Messung des Gesamtmagnesiumgehaltes

Zur Bestimmung des Gesamtmagnesiums wurde das Sediment in 0,5 ml 100% (G/V) Trichloressigsäure aufgelöst. Nach Zugabe von 5ml bidest. Wasser und Erhitzen auf 60°C im Wasserbad, wurde der ausgefallene Niederschlag abzentrifugiert und zur Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (8) verwendet. Im Überstand wurde der Gesamtmagnesiumgehalt mit dem Zeiss-Atomabsorptionsspektrophotometer (FA II, M 4 Q III, PM Q III) gemessen.

Messung der Magnesium-Ionenaktivität

Die Bakterien wurden, wie oben beschrieben, inkubiert und mit bidest. Wasser oder mit einer Lösung von 60 mMol/l NaCl und 100mMol/l KCl gewaschen und gewogen. Das Sediment wurde in 4 ml bidest. Wasser suspendiert, mit Ultraschall (MSE) unter Kühlen in Eis-Kochsalz aufgeschlossen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und im Vacuum über Silicagel gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Proben wurden dann wie in Tabelle 1 angegeben mit der dem errechneten intrazellulärem Wassergehalt entsprechenden Menge bidest. Wasser oder NaCl/KCl Lösung aufgenommen. Diese Suspension wurde auf der Ultrazentrifuge (Servall) bei 30.000 g 1 Std. zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Mg-sensitiven Elektrode (Modell 92-32, Orion Research Inc., Cambridge, Mass.) gegen eine Kalomelektrode gemessen. (Meßinstrument: Knick-pH-Meter Typ 35)

Synchronisation der Zellen

Die Synchronisation der Zellen erfolgte nach KUBITSCHKE et al. (7). Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase wurden bei 5.000 g abzentrifugiert und mit dem ursprünglichen Wachstumsmedium auf eine konstante Zellkonzentration ($E_{405} = 1,3$) eingestellt. Von dieser Suspension wurde 0,4 ml auf einen kontinuierlichen Rohrzuckergradienten 5-20 % pipettiert, und zwei Minuten bei 1.000 g im Rotor (SW 29) der auf 37°C erwärmt war, zentrifugiert (Servall). Oberhalb eines deutlich sichtbaren Ringes größerer Zellen wurden 0,2 ml entnommen und in 5 ml Wachstumsmedium mit 1,6 mMol/l $^{28}\text{MgCl}_2$ (mit etwa 2 μCi) eingeeimpft (spezifische Aktivität beim Versand: 100 $\mu\text{Ci}/2\text{mg}$, National Laboratories, Brookhaven, N.Y.). Das synchrone Wachsen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer in 5 minütigem Abstand bestimmt.

Zu verschiedenen Zeiten wurden 0,3 ml, bei höheren Zellkonzentrationen 0,2 ml entnommen und durch Sartorius-Filter gesaugt (25 mm Durchmesser, 0,45 μm Porenweite). Die Filter waren mit gekühltem Mg-freiem Medium vorgewaschen und wurden anschließend zweimal mit je 2 ml gekühltem Mg-freiem Medium gewaschen. Sofort danach wurden die Proben in einem Plastiksintillationszähler, der mit einem Probenwechsler und dem Strahlenmeßgerät FH 49c (Friesseke & Berthold) verbunden war, gemessen. Die Impulsraten wurden dabei unter Berücksichtigung des Zerfalls des ^{28}Mg korrigiert. Dieser betrug während des Versuches maximal 10%.

Die Atmung der Zellen wurde nach Inkubation in dem oben erwähnten Tris-HCl Medium im WARBURG Apparat durch direkte Manometrie mit 0,2 ml 20% KOH im Zentralgefäß gemessen. Die anaerobe Glycolyse wurde anhand des Glucoseverbrauchs in Gegenwart von 1 mMol/l KCN ermittelt. Die anschließende Glucosebestimmung wurde mit dem Blutzucker-Farbstest (Boehringer) nach Vorschrift durchgeführt. Der Proteingehalt wurde nach LOWRY et al. (8) bestimmt.

Influx von (^{14}C α)) Methyl-D-Glucopyranosid

Gewaschene Zellen wurden in 10 ml Tris-HCl Medium mit 1 g/l Glycerin anstelle von Glucose und 30 bzw. 0,3 mMol/l MgCl_2 10 Min. vorinkubiert. Nach Zugabe von etwa 2 μCi (^{14}C (α)) Methyl-D-Glucopyranosid (etwa 3 $\mu\text{Ci}/\text{mMol}$, Radiochemical Centre, Amersham) wurde jeweils 1 ml der Zellsuspension durch Satorius-Filter gesaugt (Porenweite 0,45 μm , Durchmesser 25 mm), die mit 1 g/l gekühltem inaktiven α -Methylglucosid vorgewaschen waren und einmal mit 2 ml gekühltem Glucosid-freiem Inkubationsmedium nachgewaschen. Die trockengesaugten Filter wurden in einem Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard) mit BRAY'scher Lösung (9) nach dem Auflösen der Filter gemessen.

Ergebnisse:

Das Gesamt Mg-Gehalt von E.coli ist abhängig von der Mg-Konzentration des Inkubationsmediums (Abb. 2). Einen starken Einfluß auf den Mg-Gehalt hat jedoch die Methode, mit der die Zellen zur Entfernung des Mg-haltigen Inkubationsmediums gewaschen werden. Den höchsten Mg-Gehalt mißt man, wenn die Zellen mit Wasser gewaschen werden. Bei Konzentration von 0,03 mM bis 0,3 mM Mg im Inkubationsmedium ist die Steigerung des Gesamt-Mg-Gehaltes der Zelle sehr gering, nimmt von 0,3 bis 3 mM Mg in der extrazellulären Flüssigkeit um 15% zu, und verdoppelt sich nahezu zwischen 3 und 30 mM Mg im Inkubationsmedium. Wird mit Mg-freiem Inkubationsmedium gewaschen, ist der Mg-Gehalt der Zellen niedrig und weitgehend unabhängig von der extrazellulären Mg-Konzentration.

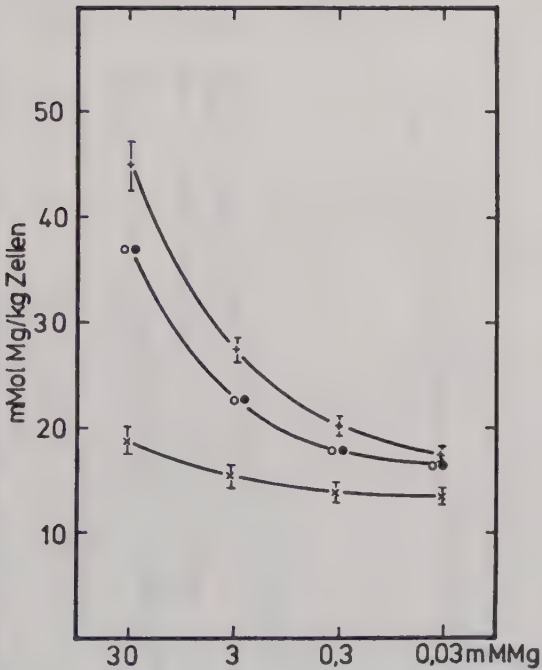


Abb. 2

Mg-Gehalt (in mMol/Kg Feuchtgewicht) von E.coli in Abhängigkeit von der extrazellulären Mg-Konzentration, Über Nacht gewachsene Zellen wurden in Tris-HCl-Medium mit verschiedener Mg-Konzentration 10 min bei 37°C inkubiert und vor der Bestimmung des Mg-Gehaltes einmal mit verschiedenen Lösungen gewaschen:
 + mit bidest. Wasser

x mit Mg-freiem Inkubationsmedium

o mit 0,4 mol/l Rohrzucker

● Sphäroplasten mit 0,4 mol/l Rohrzucker

Die Präparation der Sphäroplasten erfolgte nach GÜNTHER (6). Das Feuchtgewicht wurde aus der konstanten Relation zum Proteingehalt gewonnen.

Mit steigender Elektrolytkonzentration in den Waschlösungen nimmt der MgGehalt der Zellen ab (Abb.3)

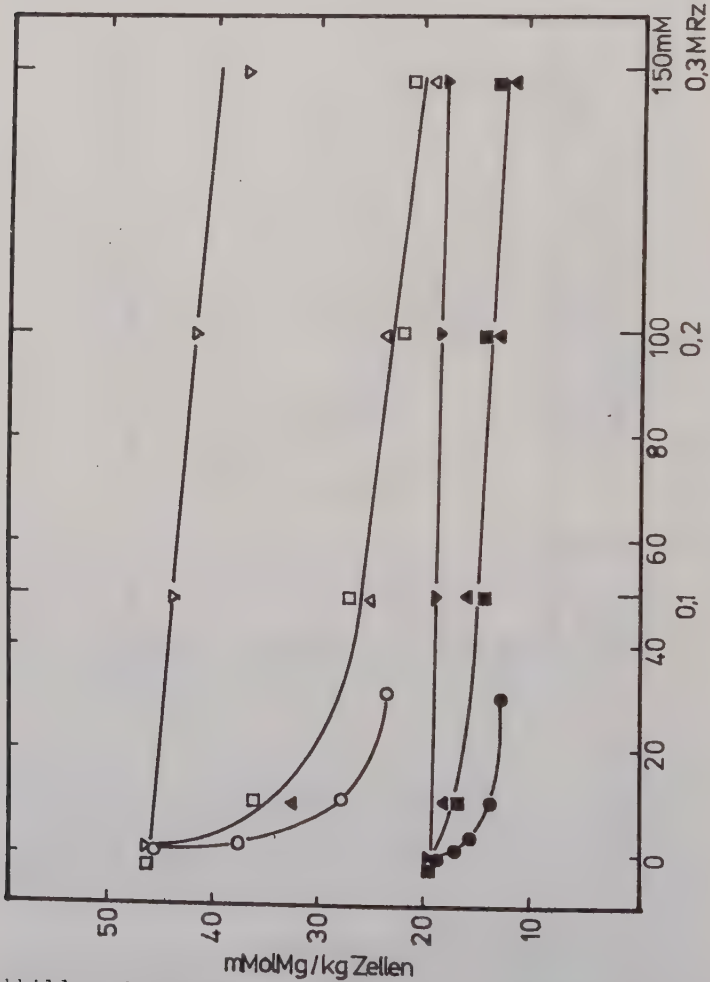


Abbildung 3: Mg-Gehalt von E.coli in Abhängigkeit von der Konzentration der Waschlösung. Die Zellen wurden 10 min bei 37°C in Tris-HCl-Medium mit 30mMol/l MgCl₂ (▽ □ △ ○) und 0,3mMol/l MgCl₂ (▼ ■ ▲ ●) inkubiert und vor der Bestimmung des Mg-Gehaltes in Lösungen verschiedener Konzentrationen gewaschen:

- ▼ ▼ Rohrzucker
- ■ KCl
- △ ▲ NaCl
- ● CaCl₂

Durch die Verwendung verschiedener Elektrolytlösungen zeigt sich weiterhin, daß dies keine spezifische Wirkung bestimmter Ionen ist, sondern von der Ionenstärke der Waschlösungen abhängt.

Die Abnahme des Mg-Gehaltes durch Waschen in verschiedenen Waschlösungen ist bei hohen Mg-Inkubationskonzentrationen etwa doppelt so stark wie bei niedrigen Mg-Konzentrationen. Beim Waschen mit Rohrzucker ist die Mg-Abnahme gering. Durch NaCl bzw. KCl Waschlösungen wird bis ca. 60 mMol Salkonzentration der Mg-Gehalt um etwa 40 % vermindert.

Hieraus läßt sich schließen, daß ein großer Teil des Magnesiums reversibel außen an der Zellmembran gebunden sein muß, da es sich durch andere Elektrolyte in der Waschlösung entfernen läßt. Aus der gleichen Abbildung ist erkenntlich, daß ein osmotischer Effekt keinen nennenswerten Einfluß hat, denn beim Waschen mit Rohrzuckerlösung erhält man den gleichen, hohen Mg-Gehalt wie nach dem Waschen mit Wasser. Beim Waschen mit Wasser wird das Kationengleichgewicht am wenigsten gestört und läßt damit die zuverlässigsten Aussagen zu. Bei Versuchen, in denen mit elektrolythaltigen Medien gewaschen wird, werden also besonders bei vorheriger Inkubation mit hohen extrazellulären Mg-Konzentrationen falsche d.h. zu niedrige Werte gemessen.

Wirkung verschiedener Stoffwechsellinhibitoren

Zur weiteren Bestätigung, ob ein wesentlicher Teil des zellulären Mg-Gehaltes, besonders bei Inkubation in Mg-reichen Medien an der Zellmembran gebunden ist, untersuchten wir den Einfluß von Stoffwechsellinhibitoren auf den Mg-Gehalt, denn eine rein chemische Bindung ist von Stoffwechsellinhibitoren unabhängig.

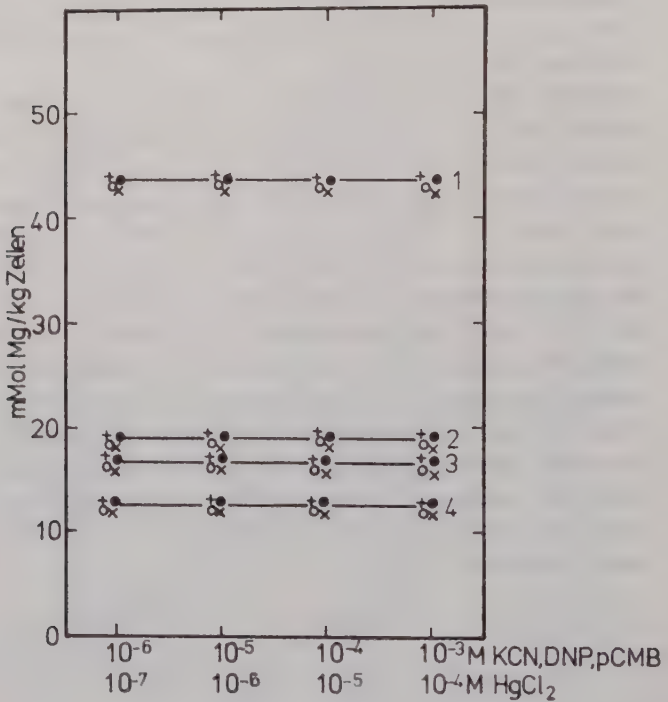


Abbildung 4: Mg-Gehalt von E.coli in Gegenwart verschiedener Stoffwechsel-Inhibitoren. Die Zellen wurden 10 min bei 37°C in Tris-HCl-Medium mit 30mMol/l $MgCl_2$ (Kurve:1,2) und 0,3 mMol/l $MgCl_2$ (Kurve: 3,4) inkubiert und vor der Mg-Bestimmung mit H_2O (Kurve: 1,3) bzw. Mg-freiem Tris-HCl-Medium (Kurve: 2,4) gewaschen.

+	KCN	○	pCMB
x	DNP (Dinitrophenol)	●	$HgCl_2$

Bei den Inhibitorkonzentrationen von 0,1 mMol/l p-Chlormercuribenzoat (p-CMB) oder 0,1 mMol HgCl_2 waren Glycolyse und Atmung vollständig gehemmt. Die Anreicherung von Mg ist daher unabhängig vom Energiestoffwechsel. Eine energieabhängige Aufnahme in die Zelle ist daher auszuschließen. Diese Ergebnisse zeigen daher, ebenso wie die Ergebnisse mit verschiedenen Waschlösungen, daß das Mg bei hohen extrazellulären Mg-Konzentrationen außen an die Membran gebunden ist.

Um den Ort der Mg-Bindung außen an der Membran zu lokalisieren, wurden Zellen mit Lysozym behandelt. Dabei wird der Lipoprotein- und zuckerhaltige Zellwall entfernt. Bei der mikroskopisch kontrollierten Präparation von Sphäroplasten zeigten sich die gleiche Mg-Bindung wie bei unbehandelten Kontrollzellen (Abb.2). Die extrazelluläre Bindung des Magnesiums scheint daher an der Zellmembran und nicht am Zellwall zu erfolgen.

Mg-Ionenaktivität

Analog zu den Inkubationsversuchen, mit denen der Gesamtmagnesiumgehalt ermittelt wurde, unternahmen wir Versuche, die die Mg-Ionenaktivität innerhalb der Zelle mittels einer Mg-sensitiven Elektrode aufschlüsseln sollten. Dabei zeigte sich, (Tab. 1, S.16) daß die intrazelluläre Ionenaktivität bei hohem extrazellulären Mg-Gehalt deutlich von der verwendeten Aufnahme- und Waschlösung abhängig ist, während bei niedrigen extrazellulären Mg-Konzentrationen der Einfluß dieser Lösungen auf die Ionenaktivität ohne Bedeutung ist.

(Mg) _{EZ}	0,3mM Mg		30 mM Mg		
gewaschen	H ₂ O	Na/K	H ₂ O	H ₂ O	Na/K
aufgen.	Na/K	H ₂ O	H ₂ O	Na/K	H ₂ O
	[mM]				
Kontrolle	1,6 ± 0,2 (n=4)	1,4±0,1 (n=7)	1,4±0,2 (n=4)	4,9±0,5 (n=6)	1,5±0,2 (n=6)
HgCl ₂ 10 ⁻⁴ M	1,7 ± 0,2 (n=7)	1,4±0,1 (n=8)	1,4±0,2 (n=4)	5,3±0,4 (n=5)	1,6±0,2 (n=4)

Tabelle 1

Intrazelluläre Mg-Ionenaktivität von E.coli

Über Nacht gewachsene Zellen wurden gewaschen und in Tris-Medium mit 0,3mM bzw. 30mM MgCl₂ für 10 min. bei 37° C mit und ohne 10⁻⁴ M HgCl₂ inkubiert, danach wie angegeben mit bidest. Wasser oder einer Lösung, die 60 mM NaCl und 100 mM KCl enthielt, einmal gewaschen. Das Sediment wurde in 4 ml H₂O aufgenommen, mit Ultraschall unter Kühlen aufgeschlossen, sofort in flüssiger Luft eingefroren, gefriergetrocknet und zur Messung der Mg-Ionenaktivität mit einer Mg-sensitiven Elektrode wie angegeben in bidest. Wasser oder der NaCl/KCl-Lösung aufgenommen. (5)

(Mittelwerte ± mittlerer Fehler des Mittelwertes)

Bei Inkubation in hoher extrazellulärer Mg-Konzentration und Waschen mit Wasser und Aufnahme des getrockneten Aufschlusses in Wasser findet man eine niedrigere Mg-Ionenaktivität trotz eines hohen Gesamt-Mg-Gehaltes. Nach Waschen mit Wasser und Aufnehmen der aufgeschlossenen und getrockneten Zellen in einer NaCl-KCl-Lösung, wird dagegen eine höhere Mg^{2+} -Ionenaktivität gefunden. Diese höhere Ionenaktivität kann durch eine verstärkte Abdissoziation von Mg^{2+} von seinen Liganden bei erhöhter Ionenstärke erklärt werden. Dieses Verhalten setzt ein Gleichgewicht zwischen freiem und gebundenem Mg^{2+} voraus. Die Mg^{2+} -Ionen befinden sich bei E.coli in der Zelle in einem Puffergleichgewicht. Ein Ergebnis, das schon früher bei Ascitestumorzellen gefunden wurden. (12)

In Gegenwart von 0,1 mMol $HgCl_2$ läßt sich kein Einfluß auf die Mg^{2+} -Ionenaktivität nachweisen, obwohl bei dieser $HgCl_2$ -Konzentration Atmung und Glykolyse vollständig gehemmt sind. Eine Erklärung bieten Ergebnisse von KENNEDY (10) und SILVER (11) die bei Versuchen mit ^{28}Mg fanden, daß durch Stoffwechselinhibitoren der Influx und der Efflux von ^{28}Mg in gleichem Maße gehemmt werden. Durch eine gleichzeitige Hemmung von Mg-Aufnahme und Mg-Abgabe läßt die Hemmung des Energiestoffwechsels demnach die intrazelluläre Mg^{2+} -Ionenaktivität und das Gesamt-Mg unverändert, wie im vorhergehenden beschrieben.

Energiestoffwechsel

Zur Kontrolle, ob die hohen Mg-Konzentrationen selbst einen Einfluß auf den Energiestoffwechsel haben, wird in weiteren Versuchen die Abhängigkeit der Atmung und Glykolyse von der extrazellulären Mg-Konzentration gemessen. In Abb. 5 ist ersichtlich, daß bei einem Gehalt von 30 mMol/l Mg die Atmung und anaerobe Glykolyse um 15% gehemmt werden.

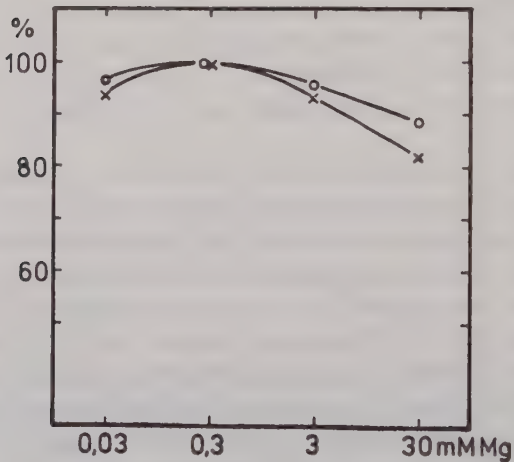


Abb.5: Atmung (o) und anaerobe Glykolyse (x) von E.coli als Funktion der extrazellulären Mg-Konzentration. Der O_2 -Verbrauch betrug bei 0,3 mMol/l $MgCl_2$ (100%) $5,0 \mu l O_2 / mg \text{ Protein} \cdot \text{min}$, und der Glucoseverbrauch bei 0,3 mMol/l $MgCl_2$ (100%) war $45 \mu g \text{ Glucose} / mg \text{ Protein} \cdot \text{min}$.

Wenn die Glykolyserate durch die Aktivität der Phosphofructokinase gesteuert wird, kann ihre Hemmung möglicherweise einen Hinweis auf die intrazelluläre Mg-Ionenaktivität geben. Bei der Prüfung im optischen Test wurde die Phosphofructokinase bei einer Mg-Ionenaktivität von etwa 3 mMol/l um 15% gehemmt (4). Die mit der Mg-sensitiven Elektrode gemessenen Werte von 1,5 M stimmen hiermit unter Berücksichtigung des Aktivitätskoeffizienten sehr gut überein.

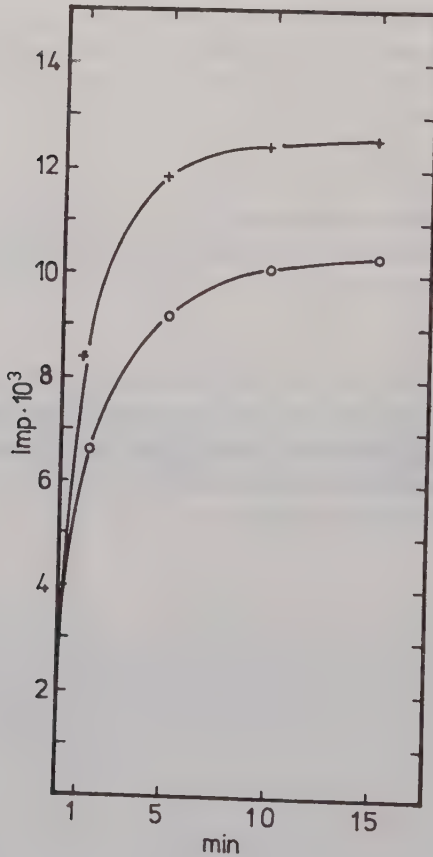
Es wäre aber auch möglich, daß die Glykolyserate durch die Permeation von Glucose durch die Zellmembran reguliert wird (13). Wir prüftendaher, ob Mg die Aufnahme von Zuckern beeinflusst.

Sowohl die Aufnahmegeschwindigkeit als auch die intrazelluläre steady-state Konzentration von ($^{14}\text{C}(\alpha)$) D-Methylglucosid ist bei einem extrazellulärem Gehalt von 30 mMol/l Mg um 15% niedriger als bei 0,3 mMol/l Mg (Abb.6)

Möglicherweise beeinflusst die höhere extrazelluläre Mg-Bindung am Zellwall die Glucosepermeation, sodaß dadurch die Glykolyse vermindert wird. Demzufolge läßt die Hemmung der Glykolyse eine Abschätzung der intrazellulären Ionenaktivität nicht zu.

Abb. 6:

Aufnahme von (^{14}C (∞))-D-Methylglucopyranosid in E.coli Zellen. Die Zellen wurden mit 30 mMol/l MgCl_2 (+) und 0,3 mMol/l MgCl_2 (o) inkubiert. Die Zähläusbeute wurde nicht berücksichtigt. Einzelheiten siehe Methodik.



Mg-Stoffwechsel Mg-arm gewachsener Zellen

Um zu prüfen, ob das Mg-Transportsystem induzierbar ist, untersuchten wir Mg-arm gewachsene Zellen. Die Zellen, die unter Mg-Mangelbedingungen gewachsen sind, zeigten ein ähnliches Verhalten wie die Normalzellen. (Abb.7)

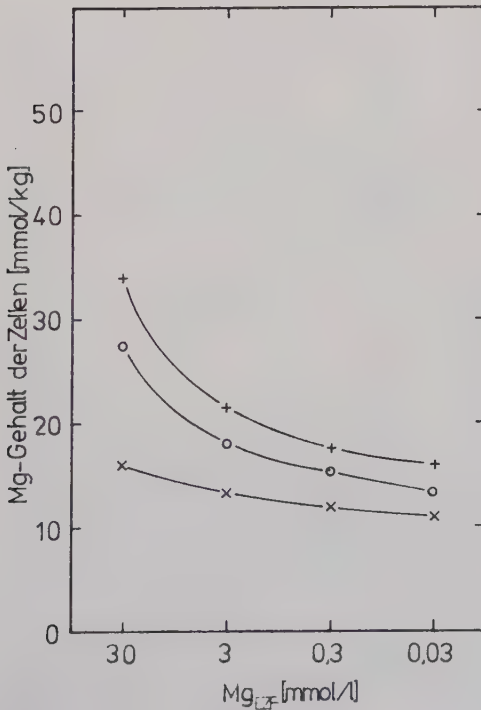


Abb. 7

Legende s. Abb. 2 S. 11

Die Mg-Mangelzellen sind mit 10^{-6} mol/l Mg gezüchtet worden.

Der Gesamt-Mg-Gehalt der Mg-armgewachsenen Zellen ist etwa um 20% niedriger, nimmt aber in dem gleichen Maße mit fallender extrazellulärer Mg-Konzentration ab, so daß bei Zellen, die unter Mangelbedingungen aufgewachsen sind, keine verstärkte Mg-Anreicherung bei niedriger Mg-Konzentration im Inkubationsmedium nachzuweisen ist. Der geringere Unterschied zwischen Zellen, die in H_2O und in Mg-freiem Medium gewaschen wurden, läßt den Schluß zu, daß sich schon während des Wachstums unter Mg-Mangelbedingungen weniger Mg an der Zellmembran befand, das durch die Waschprozedur mit elektrolythaltigen Waschlösungen entfernt wurde. Abb. 3 zeigt diesen Einfluß deutlich. Nach anderen Untersuchungen war der Transport von ^{28}Mg in Mg-arm gewachsene Zellen nach Reinkubation bei niedriger ^{28}Mg -Konzentration nur wenig stärker als bei Mg-reich gewachsenen Zellen (14,15). Ein Unterschied zwischen Mg-arm und Mg-reich gewachsenen Zellen ist im Mg-Transport demnach nicht deutlich ersichtlich.

Mg-stoffwechsel und -konzentration

Um zu prüfen, in welcher Phase des Wachstums Mg aufgenommen wird, wurde der Mg-Gehalt an synchronisierten Zellen gemessen. Die Zellen wurden bei diesen Versuchen mit Wasser und Mg-freiem Inkubationsmedium gewaschen. Entsprechend den vorangegangenen Ergebnissen wurde hierbei im Wesentlichen nur die Aufnahme von ^{28}Mg in das Zellinnere gemessen, da das membrangebundene Mg durch Waschen entfernt wurde. Es zeigt sich, daß bei der analog zur Generationszeit stufenförmig zunehmenden Zellzahl der Mg-Gehalt der Zellen kontinuierlich zunimmt (Abb. 8). ^{28}Mg wird also in gleichem Maße aufgenommen, wie sich die Menge der intrazellulären Komplexbildner DNA und RNA vermehrt (16). Entsprechend den Versuchen mit verschiedenen Waschlösungen (s. Abl. 2 u. 3) wurde auch hier eine etwa 15 % höhere ^{28}Mg -Aktivität gemessen, wenn die Zellen nach der Inkubation mit Wasser statt mit Mg-freiem Medium gewaschen wurden.

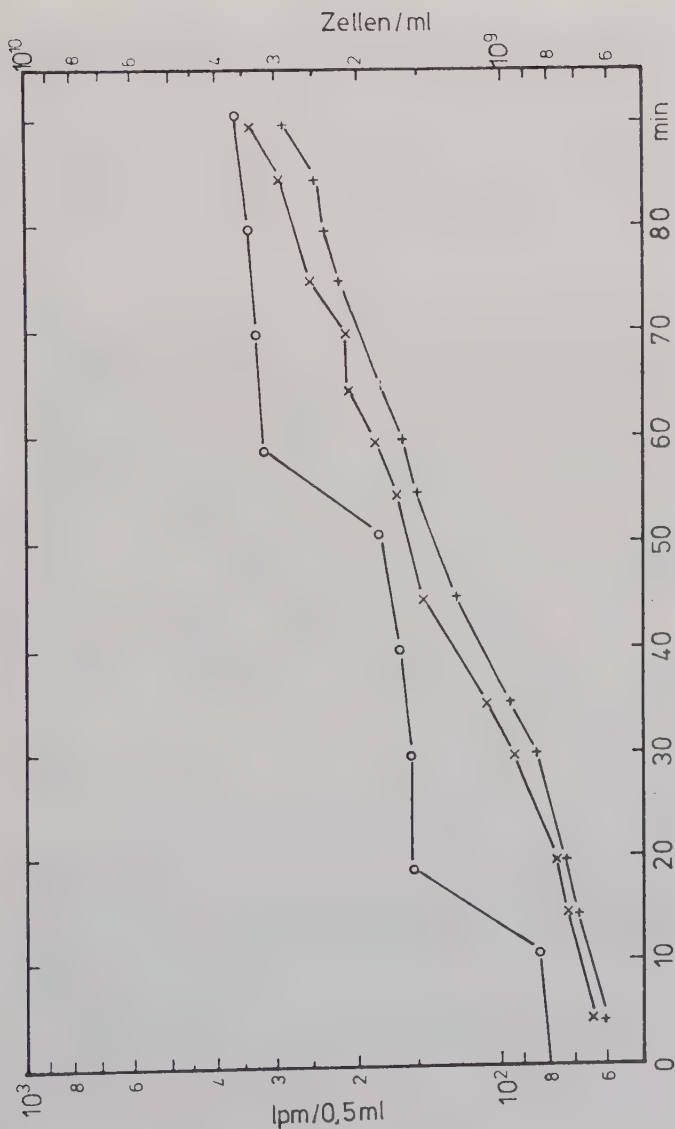


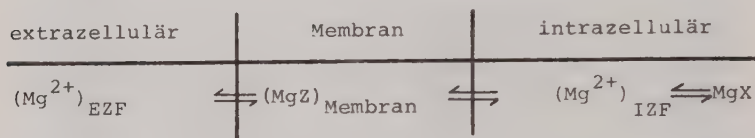
Abb. 8: Zellzahl (O) und ²⁸Mg-Radio-Aktivität (+,x) synchronisierter E.coli-Zellen

²⁸Mg-Aktivität nach Waschen der Filter mit H₂O (x)

²⁸Mg-Aktivität nach Waschen mit eiskaltem Mg-freiem Inkubationsmedium (+); (Einzelheiten s. Methodik)

Diskussion

Die Ergebnisse der Versuche lassen folgendes Schema zu:



Das extrazelluläre Mg^{2+} steht im Gleichgewicht mit dem an der Membran gebundenen Mg. Nach Abbildung 2 können die Komplexbildungskonstanten für das an die Membran gebundene Mg $(MgZ)_{Membran}$ auf etwa $10^{1,5} M^{-1}$ geschätzt werden. Das membrangebundene Mg kann zum großen Teil durch Waschen mit Mg-freien Lösungen höherer Ionenstärke entfernt werden (Abb.3). Dieser Mg-Anteil ist besonders groß bei höherer extrazellulärer Mg-Konzentration. Die Mg-Komplexe sind auf der Zellmembran zu lokalisieren, denn bei der Präparation mit Lysozym, wobei der Zellwall entfernt wurde, fand sich kein Unterschied im Gesamt-Mg-Gehalt im Vergleich zu den Kontrollzellen mit Zellwall.

Das intrazelluläre Mg ist zu einem Teil ionisiert und befindet sich im Puffergleichgewicht mit komplexgebundenem Mg (MgX) . Die Aktivität des ionisierten Mg beträgt $10^{-3} M$, sie hat damit einen Wert bei dem die Mg-abhängigen Enzyme optimal aktiviert sind; andererseits liegt dieser Wert niedrig genug, damit z.B. die Proteinbiosynthese unter der Beteiligung von Polyaminen und unter der Kontrolle von Initiations- und Dissoziationsfaktoren (21,22,23) ablaufen kann und eine Fehlcodierung (19,20) durch hohe Mg-Konzentration vermieden wird.

Die bei derartigen in vitro Versuchen zu Proteinsynthese notwendigen intrazellulären Mg-Konzentrationen von 4mMol/l haben unter der Berücksichtigung des unbekannten Aktivitätskoeffizienten des intrazellulären Mg^{2+} , der 0,3-0,5 beträgt, den gleichen Wert wie die von uns gemessene Mg-Ionenaktivität von 1,5-2 mMol/l.

Der Transport von extrazellulärem Mg^{2+} in die Zelle ist kein Diffusionsprozeß. KENNEDY (10) und SILVER (11) kamen zu dem Ergebnis, daß Mg^{2+} durch einen stoffwechselabhängigen Mechanismus durch die Zellmembran von *E. coli* transportiert wird, der offensichtlich einer Sättigungskinetik gehorcht. $^{28}Mg^{2+}$ gelangt dabei im Austausch gegen nicht markiertes $^{28}Mg^{2+}$ in die Zelle. Der zelluläre Mg-Gehalt bleibt dabei, wie unsere Messungen ergaben, unverändert. Sowohl der Mg-Gesamtgehalt als auch die intrazelluläre Mg-Ionenaktivität ließen sich in unseren Versuchen durch Stoffwechsellinhibitoren, die den Mg-Transport und den Stoffwechsel hemmen, nicht signifikant beeinflussen. Dieses Verhalten spricht dafür, daß hier ein carrierbegünstigter Mg-Austausch vorliegt, wobei Influx und Efflux in gleichem Maße durch Stoffwechsellinhibitoren gehemmt wurden, sodaß die intrazelluläre physiologische Mg-Verteilung erhalten bleibt.

Es ist zu vermuten, daß dieses Mg-Transportsystem mit dem von LUSK et al. (17) beschriebenen identisch ist, welches durch Mutation ausgeschaltet wurde. Derartige Mutanten benötigen eine 100 fach höhere extrazelluläre Mg-Konzentration für halbmaximales Wachstum als der Wildtyp.

NELSON und KENNEDY (14) beschrieben ein weiteres Mg-Transportsystem, das im Gegensatz zu dem vorangehend beschriebenen eine geringere Affinität aufweist, kein Cobalt transportiert und durch hohe extrazelluläre Mg-Konzentrationen reprimiert wird. Dieses System wurde durch Züchtung Cobalt resistenter Mutanten entdeckt.

Genauere Eigenschaften wie etwa eine Abhängigkeit vom Zellstoffwechsel sind noch nicht bekannt.

Es scheint daher in *E.coli* mehrere Transportsysteme für Mg mit unterschiedlichen Eigenschaften zu geben. Diese Systeme, wie sie nach Wachsen normaler Zellen in niedriger extrazellulärer Konzentration vorliegen, scheinen wegen des Austauschtransportes eine intrazelluläre Anreicherung zu verhindern, auch wenn die Zellen nach Wachsen in Mg-armer Lösung in ein Mg-reiches Medium gebracht werden. Andererseits dürfte es bei diesem Carrier-System auch zu keinem Nettotransport von Mg kommen. Wenn die Zellen wachsen, muß es aber eine Netto-Aufnahme geben. Diese Nettoaufnahme könnte zustande kommen, indem der Influx und Efflux von Mg nicht mehr gekoppelt sind. Es wäre aber auch denkbar, daß hierfür ein weiteres Transportsystem existiert. Die kontinuierlich steigende ^{28}Mg -Aktivität während des synchronisierten Wachstums, die ein Maß für den Mg-Gehalt der Zellen ist, erfolgt parallel zur Zunahme des Protein- und DNA-Gehaltes. Der Mg-Gehalt der Zelle hat offensichtlich einen direkten Bezug zur Zellmasse, bzw. zur steigenden Menge intrazellulären Mg-Komplexbildner. Eine weitergehende Aussage über den Mechanismus des Mg-Transportes während des Wachstums, bzw. während der einzelnen Wachstums- und Teilungsphasen ist bei derartigen Versuchen nicht möglich. Wie Abb. 8 zeigt, beträgt der gesamte Zellzyklus bei *E.coli* nur ca. 40 Min. Die Mengen synchronisierter Zellen, die gewonnen werden können, reichen nicht aus, um nach Reinkubation die ^{28}Mg -Fluxe zu messen. Außerdem würden Flux-Messungen länger dauern als die jeweilige Generationsphase.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Gesamt-Magnesium-Gehalt von E.coli steigt bei höheren extrazellulären Magnesium-Konzentrationen stark an. Die Ursache ist in einer erhöhten Mg-Bindung an die Zellmembran zu sehen. Durch Waschen mit Elektolyt-Lösung kann das an die Zellmembran gebundenen Magnesium wieder entfernt werden, ohne Veränderung der intrazellulären Mg-Ionenaktivität. Beim Inkubieren mit hoher extrazellulärer Mg-Konzentration erhöht sich die intrazelluläre Mg-Ionentätigkeit nur geringfügig. Die Stoffwechselinhibitoren HgCl_2 , pCMB, DNP und KCN hatten weder Einfluß auf den Gesamt-Mg-Gehalt, noch auf die intrazelluläre Ionenaktivität. Diese Ergebnisse stimmen überein mit den Einflüssen von Inhibitoren auf den ^{28}Mg Influx und Efflux. Das Mg permeiert nicht frei. Bei nicht wachsenden E.coli Zellen müssen Mg Influx und Efflux gekoppelt sein.

Versuche an synchronisierten Zellen zeigen, daß der Mg-Gehalt kontinuierlich und im gleichen Maße zunimmt, wie der Gehalt an DNA, RNA und Protein.

LITERATUR

1. Günther, T. (1965) Habil-Schrift, Med.Fak.FU Berlin
2. Günther, T. und Mariß, P. (1968) Z. Naturforschg.23b,
334 - 338
3. Günther, T. und Mariß, P. (1968) Hoppe-Seyler's Z. 349,
623-631
4. Mariß, P. (1969) Dissertation, Med.Fak., FU Berlin
5. Günther, T. und Dorn, F. (1969) Z.Naturforschg. 24b,713-717
6. Günther, T. und Dorn, F. (1966) Z.Naturforschg. 21b,
1076-1081
7. Kubitschek, H.E., Freedman, M.L. und Silver, S. (1971)
Biophys.J.II,787-797
8. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. Farr, A.L. und Randall,R.J.
(1951) J. Biol.Chem. 193, 265-275
9. Bray, G (1960),Analyt. Biochem. 1,279-281
10. Lusk, J.E. und Kennedy, E.P. (1969) J.Biol.Chem. 244,
1653-1655
11. Silver, S. (1969)
Proc.Nat.Acad.Sci. 62, 764-771
12. Günther, T. (1966)
Z. Naturforschg. 21 b, 1174-1177
13. Kotyk, A. und Kleinzeller, A. (1967) Biochim. Biophys.
Acta 135,106-111
14. Nelson, D.L. und Kennedy, E.P. (1972)
Proc.Nat.Acad.Sci. 69,1091-1093
15. Silver, S. und Clark, D. (1971) J.Biol.Chem. 246,569-576
16. Sokatch, R.J. (1969), Bacterial Physiology and Metabolism,
A.P. London, New York, p. 22
17. Lusk, J.E., Williams, R.J.P. und Kennedy, E.P. (1968)
J.Biol.Chem. 243,2618-2624
18. Rogers, A. (1964),Biochem. J. 90, 548-555
19. Szer, W. und Ochoa, S.(1964), J.Mol.Biol. 8,823-834
20. Davies, J., Gilbert, W. und Gorini, L. (1964)
Proc.Nat.Acad.Sci.,51,883-890
21. Lucas-Lenard, J. und Lippmann, F.(1967), Proc.Nat.Acad.
Sci., 57,1050-1057
22. Subramanian, A.P., Ron, E.Z. und Davis, B.D.(1968)
Proc.Nat.Acad.Sci., 61,761-767
23. Lucas-Lenard, J. and Lipmann, F.(1971) Ann.Rev.Biochem.
40, 409-448
24. Günther, T., Averdunk, R., 1970, Z.Klin.Chem.,Klin.
Biochem.8, 621

Herrn Prof. Dr. med. T. Günther danke ich
für die Überlassung des Themas und seine
Unterstützung.

Lebenslauf

Am 23.10.1944 wurde ich, Christian-Friedrich Hoffmann, als erstes von zwei Kindern des Arztes Dr. med. Oswald Hoffmann und seiner Ehefrau Christa geb. Herzog in Liegnitz/Schlesien geboren. Im Januar 1945 mußten meine Eltern flüchten und ließen sich in Bergheim/Erft nieder, nachdem mein Vater aus englischer Kriegsgefangenschaft entlassen wurde. 1948 zogen meine Eltern nach Berlin um, dort wurde ich im Jahre 1951 eingeschult. Von 1956 bis 1960 ging ich in ein Internat in Xanten auf das Gymnasium und besuchte danach das Kant-Gymnasium in Berlin-Spandau, an dem ich 1965 das Abitur bestand.

Im SS 65 begann ich mein Medizinstudium an der Freien Universität Berlin und legte 1966 die naturwissenschaftliche und 1968 die ärztliche Vorprüfung ab. Das 7. und 8. Semester studierte ich an der Bonner Friedrich-Wilhelm Universität und kehrte zum 9. Semester an die FU-Berlin zurück.

Im WS 69/70 begann ich unter Anleitung von Prof. Dr. med. Th. Günther meine Dissertationsarbeit mit dem Thema "Über den Magnesium-Stoffwechsel von Escherichia coli".

Im Sommer 1972 bestand ich die ärztliche Prüfung. Die freien 4 Monate meiner Medizinalassistenzeit arbeitete ich am physiologisch-chemischen Institut der FU-Berlin und leistete den Rest der MA-Zeit am Städt. Krankenhaus am Urban ab. Vom 1.11.1973 bis zum 30.3.1975 war ich an der chirurgischen Abteilung des Urban-Krankenhauses als Vollassistent tätig; während dieser Zeit heiratete ich am 17.5.1974 Frä. Brigitte Linneweber aus Leopoldshöhe.

Seit dem 1.4.1975 arbeite ich an der Abteilung für Orthopädie und Traumatologie im Krankenhaus am Urban wo ich die Facharztanerkennung für Orthopädie erwerben möchte.

